

ESTUDIO 4

Microbiología del agua mineromedicinal del Balneario de Paracuellos de Jiloca

Title in English: *Microbiology of the natural mineral water of Paracuellos de Jiloca Spa*

M.^a Carmen de la Rosa Jorge*, Victoria Fernández García, Concepción Pintado García, Carmina Rodríguez Fernández

Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense, Madrid.

*delarosa@ucm.es

An. Real. Acad. Farm. Vol 84, Special Issue (2018) pp. 68-80.

RESUMEN	ABSTRACT
<p>Se ha estudiado la microbiota autóctona y alóctona del agua mineromedicinal del Balneario de Paracuellos de Jiloca (Zaragoza). No se han encontrado indicadores fecales ni microorganismos patógenos en 250 mL de agua. El número total de microorganismos ha sido de $3,4 \times 10^6$/mL, siendo el número de bacterias viables heterótrofas y oligotrofas <100 ufc/mL. La microbiota autóctona está constituida, principalmente, por bacterias Gram positivas de los <i>Phyla Firmicutes</i> y <i>Actinobacteria</i>. Los géneros más frecuentes han sido: <i>Staphylococcus</i>, <i>Micrococcus</i> y <i>Rhodococcus</i>. Se han detectado bacterias con actividades amonificantes, proteolíticas, amilolíticas y celulolíticas en 100 mL que contribuyen a la autodepuración de estas aguas, así como bacterias oxidantes del azufre y sulfato reductoras que influyen en la composición química de las mismas.</p> <p>Palabras clave: Manantial sulfurado; Microbiota autóctona; Biodiversidad; Bacterias del azufre.</p>	<p>The autochthonous and allochthonous microbiota of the natural mineral water of Paracuellos de Jiloca Spa have been studied. Neither faecal indicators nor pathogenic microorganisms were found in 250 mL of water. The total number of microorganisms in the water was of 3.4×10^6/mL and the number of heterotrophic and oligotrophic viable bacteria was <100 cfu/mL. The autochthonous microbiota mostly belongs to Gram-positive bacteria, from the <i>Phyla Firmicutes</i> and <i>Actinobacteria</i>. The most frequently found genera were <i>Staphylococcus</i>, <i>Micrococcus</i> and <i>Rhodococcus</i>. Moreover ammonifying, proteolytic, amylolytic and cellulolytic bacteria have been detected in 100 mL, all of them involved in self-purification process of water, as well as oxidants of sulphur and reducing sulfates bacteria that influence in the chemical composition of themselves.</p> <p>Keywords: Sulfide spring; Autochthonous microbiota; Biodiversity; Sulphur bacteria.</p>

1. INTRODUCCIÓN

El Balneario de Paracuellos de Jiloca se encuentra situado en el municipio del mismo nombre, en la provincia de Zaragoza, perteneciente a la Comunidad Autónoma de Aragón. El término municipal se encuentra en la comarca de Calatayud en el valle del río Jiloca.

Las propiedades curativas de las aguas de esta localidad ya eran conocidas por los romanos y utilizadas por los lugareños desde tiempos remotos. En el siglo XVII Limón Montero describe sus propiedades medicinales y realiza un análisis en el que descubre la presencia de azufre y salitre: “...el agua es cristalina con olor desagradable y sabor a cieno...Las aguas de la fuente de Paracuellos tienen muy eficaz virtud de mover el vientre por el salitre ayudadas de la relajación que hace en el estómago el azufre” (1). En 1848 se edifica un pequeño Balneario que obtuvo la declaración de utilidad pública en 1869 (2), denominado, posteriormente, Baños Viejos ya que en 1874 surge otro manantial y se construye un nuevo establecimiento llamado Baños Nuevos. En 1899 se unen los dos balnearios con un único propietario. Durante la guerra civil los Baños Nuevos fueron utilizados como hospital y posteriormente el edificio sufrió un incendio que lo dejó inservible. El Balneario actual comprende el edificio de los Baños Viejos que ha sido rehabilitado totalmente y se le ha incorporado un parque termal con grandes zonas ajardinadas, instalaciones deportivas y piscinas. (Figuras 1 y 2).



Figura 1. Edificio del balneario de Paracuellos.

Las aguas mineromedicinales no son estériles, como todos los ecosistemas acuáticos tienen una microbiota autóctona que depende de su composición química y de la temperatura de las mismas. En este trabajo hemos estudiado, por primera vez, esta microbiota autóctona no solo para conocer su número, identidad y diversidad sino también su actividad metabólica que puede contribuir a las características químicas del agua y que tanta importancia tiene en la autodepuración de la misma. Además, se han analizado los microorganismos que pueden suponer un riesgo para la salud de los usuarios que reciben los tratamientos terapéuticos en el Balneario, como

son los indicadores de contaminación fecal y algunos patógenos que se transmiten por el agua.



Figura 2. Parque termal.

2. RESULTADOS

2.1. Muestras

Estas aguas mineromedicinales emergen a una temperatura de 16 °C, tienen un pH neutro y se clasifican como hipotermales, de mineralización fuerte, cloruradas, sulfatadas, sódicas, sulfuradas y extremadamente duras (3).

El Balneario utiliza el agua mineromedicinal procedente de un manantial y de un sondeo que se encuentra en el exterior en un pequeño promontorio detrás del edificio y protegido por una caseta (Figura 3). El agua se capta con una bomba, se almacena en dos grandes depósitos y se conduce por tuberías a las instalaciones del balneario para su uso en los distintos tratamientos. Además los agüistas utilizan para los tratamientos hidropónicos el agua de una fuente situada en una galería en el interior del establecimiento balneario (Figura 4).



Figura 3. Punto de emergencia.



Figura 4. Fuente.

Para realizar este estudio se tomaron muestras del agua procedente del sondeo y de la fuente en octubre del año 2016. Las muestras se recogieron en recipientes estériles de 1,5 litros, por duplicado, y se trasladaron, a temperatura ambiente y en oscuridad, hasta el laboratorio analizándolas antes de las 24 horas.

2.2. Microorganismos totales y vivos

El número de todos los microorganismos presentes en el agua se ha determinado por el método del recuento directo, utilizando varios fluorocromos: naranja de acridina, Syto®9 y yoduro de propidio (BacLight Live/Dead) que nos permite distinguir los microorganismos muertos de los vivos. Las muestras teñidas se filtraron por una membrana Nucleopore de 0,2 μm de diámetro de poro y se observaron y contaron con un microscopio de fluorescencia y objetivo de inmersión.

El número de microorganismos totales ha sido de $3,4 \times 10^6$ /mL y el porcentaje de vivos, 77,2 %. Estos resultados son semejantes a los encontrados en otro manantial de agua mineromedicinal sulfurado (4), siendo mayor el porcentaje de microorganismos vivos. Los recuentos obtenidos por esta técnica suelen ser altos y mayores que los obtenidos por cultivo ya que se cuentan también los microorganismos muertos y los autótrofos que no pueden multiplicarse en los medios heterótrofos utilizados.

2.3. Bacterias aerobias viables

En las aguas mineromedicinales es útil la determinación del número de bacterias aerobias viables, a distintas temperaturas, pues permite conocer si ha habido contaminación del acuífero o si el agua ha sido tratada con algún proceso de desinfección. En este estudio se han determinado las bacterias heterótrofas, utilizando el medio agar extracto de levadura (5) y las bacterias oligotrofas empleando agar R₂A (6), a dos temperaturas 22 °C y 37 °C, mediante las técnicas de filtración, con filtros

Millipore de 0,22 μm y de dilución en placa. Los resultados se han expresado en unidades formadoras de colonias por mL de agua (ufc/mL).

El número de bacterias viables ha sido menor de 100 ufc/mL en todos los casos (Tabla 1), presentando más bacterias oligotrofas que heterótrofas, propio de aguas subterráneas pobres en materia orgánica (7). Estas cifras bajas indican que hay una buena protección del acuífero. Se ha observado una relación con la temperatura de emergencia del agua, 16 °C, ya que el número de bacterias viables incubadas a 22 °C ha sido mayor que a 37 °C. Los valores obtenidos son semejantes a los de otros manantiales españoles hipotermales, sulfurados (8) o extremadamente duros (9, 10).

Tabla 1. Número de bacterias aerobias viables (ufc/mL).

Bacterias	Tª	Manantial	Fuente
<i>Heterótrofas</i>	22 °C	42	31
	37 °C	9	7
<i>Oligotrofas</i>	22 °C	88	27
	37 °C	19	-

2.4. Microorganismos de interés sanitario

Las aguas mineromedicinales se utilizan en los balnearios con fines terapéuticos, por lo que deben tener ausencia de bacterias que indiquen contaminación fecal y de microorganismos patógenos que puedan transmitirse a través del agua por vía oral, tópica o inhalatoria.

Para detectar la posible presencia de indicadores fecales se han realizado los recuentos de coliformes totales y fecales, enterococos, esporas de *Clostridium* sulfito-reductores y *C. perfringens*, además se ha investigado la presencia de *Escherichia coli*, *Salmonella* y *Pseudomonas aeruginosa*, utilizando los métodos oficiales españoles de las aguas de consumo humano (5) y de bebida envasadas (11). También se ha estudiado la presencia de *Staphylococcus aureus* en 250 mL de agua, sembrando en caldo triptona soja y aislando en agar Baird-Parker y de *Legionella pneumophila*, según la Norma ISO 11731 (12).

No se han encontrado ninguno de los microorganismos indicadores de contaminación fecal, ni de las bacterias patógenas estudiadas en 250 mL de agua.

2.5. Microorganismos de interés ecológico

La microbiota autóctona de las aguas mineromedicinales es de gran interés ecológico ya que participa en los procesos biogeoquímicos del carbono, nitrógeno y

azufre. Estos microorganismos poseen diversas capacidades metabólicas, transformando los compuestos orgánicos en inorgánicos lo que contribuye a la autodepuración de las aguas y mantiene el equilibrio biológico de estos ambientes hidrotermales (7).

En este estudio se ha determinado el número de bacterias que intervienen en el ciclo del carbono (proteolíticas, amilolíticas, celulolíticas), del nitrógeno (amonificantes, nitrificantes) y del azufre (sulfato reductoras, oxidantes del azufre). Se ha utilizado la técnica del número más probable (NMP) y los medios descritos en otro trabajo (9), incubando a 30 °C durante 30 días. Los resultados se han expresado como NMP de microorganismos en 100 mL de agua (Tabla 2).

Tabla 2. Número de microorganismos de interés ecológico.

Microorganismos	Manantial
<i>NMP/100mL</i>	
Proteolíticos	1100
Amilolíticos	21
Celulolíticos	9,1
Nitrificantes	<3
Amonificantes	1500
Sulfato-reductores	23
<i>ufc/ 100 mL</i>	
Halófilos	4
Oxidantes de azufre	120
Hongos	6

El agua del manantial ha presentado bacterias proteolíticas, amilolíticas, celulolíticas y amonificantes. Las bacterias proteolíticas detectadas hidrolizan la gelatina y se han identificado como *Staphylococcus*, *Rhodococcus* y *Leifsonia aquatica*. Las bacterias amilolíticas son de los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Leifsonia* y las celulolíticas del género *Cellulomonas*. En cuanto a las bacterias amonificantes que producen amoníaco de la asparagina pertenecen, principalmente, a la especie *Stenotrophomonas maltophilia*.

Los microorganismos con actividades proteolíticas, amilolíticas y amonificantes son muy abundantes en los hábitats naturales y son importantes en la eliminación de materia orgánica en las aguas subterráneas, siendo frecuente su presencia en manantiales mineromedicinales, tanto sulfurados (4, 8, 13, 14, 15) como sulfatados (16, 17) y extremadamente duros (9, 10).

Además, se han encontrado bacterias que intervienen en el ciclo del azufre tanto sulfato reductoras como oxidantes del azufre. Las bacterias sulfato reductoras constituyen un grupo ampliamente distribuido en la naturaleza, se encuentran en ambientes acuáticos dulces y salinos y se han detectado en otros manantiales mineromedicinales sulfatados (16, 17) y sulfurados (8, 13,14). En condiciones de anaerobiosis reducen el sulfato mediante reducción desasimiladora, primero a sulfito y luego a sulfhídrico que se excreta. El sulfhídrico es muy tóxico para los organismos aerobios por lo que puede ejercer una actividad antimicrobiana y disminuir la microbiota autóctona del agua. La mayoría de las bacterias sulfato reductoras son heterótrofas y utilizan compuestos orgánicos como fuente de energía. Para su detección, hemos utilizado un medio con lactato y sulfato, en el que se produce un precipitado negro de sulfuro de hierro debido a la reducción del sulfato (Figura 5).

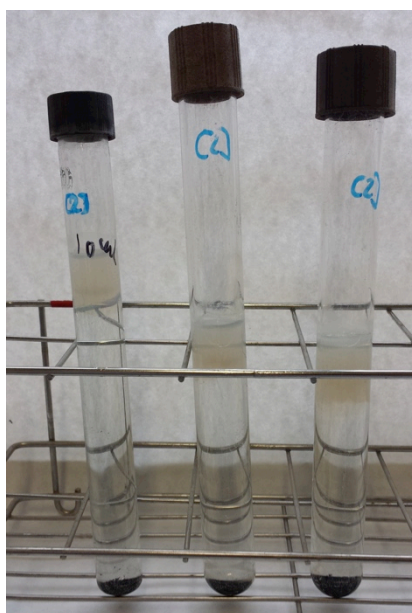


Figura 5. Cultivo de bacterias sulfato reductoras.

El sulfhídrico producido por las bacterias sulfato reductoras puede ser oxidado a azufre elemental por bacterias aerobias quimiolitotrofas o por anaerobias fototrofas, depositándose en forma de glóbulos intra o extra celulares y originando copos o masas blanquecinas macroscópicas. (Figura 6). Posteriormente el azufre se oxida a sulfato que es reducido nuevamente a sulfhídrico, completándose el ciclo (18). Las bacterias oxidantes del azufre pueden oxidar distintos compuestos reducidos: sulfhídrico, azufre elemental o tiosulfato por lo que para su detección en el laboratorio se emplean medios con tiosulfato que son más estables (19). En este estudio se han encontrado bacterias aerobias quimiolitotrofas pero no fototrofas. En otros manantiales sulfurados también se han detectado bacterias que oxidan el azufre (8, 13, 15). Una consecuencia importante del ciclo del azufre es la corrosión anaerobia de estructuras de hierro y acero que pueden destruir tuberías y depósitos. En este

proceso las bacterias tienen un papel decisivo ya que el sulfhídrico formado ataca al hierro metálico que se convierte en sulfuro ferroso e hidróxido ferroso (20).

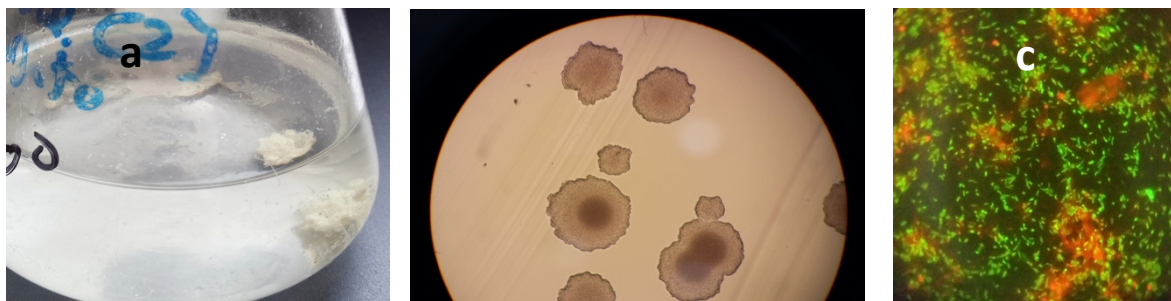


Figura 6. Bacterias oxidantes del azufre: a) cultivo en caldo tiosulfato; b) colonias en agar tiosulfato; c) tinción fluorescente con naranja de acridina.

Debido al alto contenido en sales de estas aguas, se han estudiado los microorganismos halófilos por el método de filtración, utilizando agar halófilo con 15 % de cloruro sódico e incubando a 30 °C, durante 7 días. Se han detectado en un número muy pequeño, 4 en 100 mL, son halófilos facultativos y corresponden a los géneros *Staphylococcus* y *Micrococcus*. Su presencia es habitual en aguas salinas y se han encontrado en otros manantiales de mineralización fuerte (9, 13, 16, 21).

También se han estudiado otros tipos de microorganismos: hongos, bacterias del hierro, cianobacterias y algas, utilizando los métodos descritos en otro trabajo (9). Se han encontrado un número bajo de hongos, 6 por 100 mL, que pertenecen a hongos filamentosos de los géneros *Penicillium* y *Cladosporium*. Los hongos en aguas minerales suelen proceder del suelo y se han detectado en pequeño número en otros manantiales mineromedicinales sulfurados (4, 8, 13, 14, 15).

No se han encontrado bacterias del hierro, cianobacterias ni algas.

2.6. Identificación de bacterias heterótrofas

Las cepas aisladas en los distintos medios de recuento se han identificado por varias características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas descritas en un trabajo anterior (22). Además se utilizó el sistema de identificación miniaturizado API® (bioMérieux), empleando las galerías: 20 NE para los bacilos Gram negativos no fermentadores, Staph para los cocos Gram positivos y Coryne para los bacilos Gram positivos irregulares.

Se han aislado 42 cepas de bacterias viables heterótrofas y oligotrofas, que corresponden a los tipos morfológicos de bacilos Gram negativos (21,5 %), bacilos Gram positivos (40,4 %) y cocos Gram positivos (38,1 %). Según la clasificación taxonómica del Manual de Bergey (23) las cepas identificadas pertenecen, en su

mayoría, a los *Phyla: Actinobacteria* (45,2 %) y *Firmicutes* (33,3 %) y en menor proporción al *Phylum Proteobacteria* (21,5 %) (Figura 7).

En estas aguas se ha detectado una gran proporción de bacterias Gram positivas lo que coincide con lo encontrado en otros manantiales minerales sulfurados (4) y carbónicos (24, 25). El predominio de bacterias Gram positivas sobre las Gram negativas puede ser debido a las características químicas del manantial ya que tanto la elevada concentración de sales, como la producción de carbónico o sulfhídrico tienen un efecto antimicrobiano, sobre todo contra las bacterias Gram negativas.

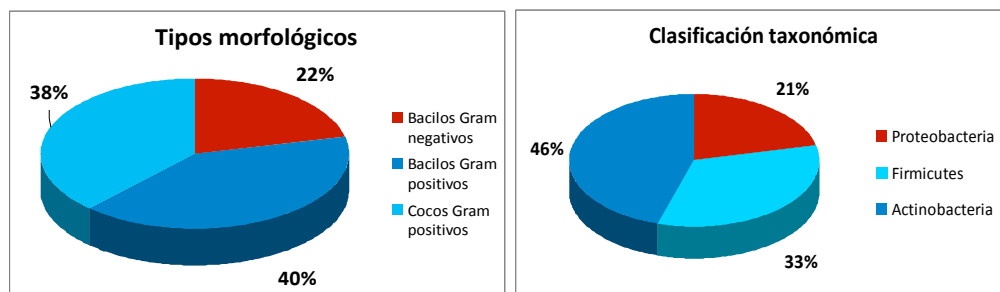


Figura 7. Clasificación morfológica y taxonómica (% cepas).

Entre los bacilos Gram negativos, las especies más frecuentes han sido *Stenotrophomonas maltophilia* y *Pseudomonas fluorescens*. Ambos géneros están ampliamente distribuidos en la naturaleza y pueden considerarse autóctonos de aguas minerales (26, 27).

Los bacilos Gram positivos detectados son, en su mayoría, de morfología irregular y pertenecen a los géneros *Rhodococcus*, *Leifsonia* y *Cellulomonas*. Así mismo, se ha encontrado un pequeño número de cepas de bacilos esporulados del género *Bacillus*. *Rhodococcus* y *Bacillus* se encuentran tanto en ambientes terrestres como acuáticos, y son frecuentes en manantiales termales (4, 10, 22). La principal característica de *Cellulomonas* es su capacidad para metabolizar la celulosa y su hábitat principal es el suelo pero también se ha encontrado en aguas minerales (4, 21, 22, 25). *Leifsonia aquatica* (antes *Corynebacterium aquaticum*) vive en el agua y se ha aislado en otros manantiales mineromedicinales (9, 10, 16).

Los cocos Gram positivos se encuentran en elevada proporción y corresponden a los géneros *Staphylococcus*, *Micrococcus* y *Vagococcus*. Los dos primeros son muy ubicuos y debido a su resistencia a elevadas concentraciones de sal se han detectado en otros manantiales mineromedicinales (9, 16, 22). Además se ha aislado *Vagococcus fluvialis* cuyo hábitat es el agua dulce y que también hemos encontrado en otros manantiales minerales sulfatados (21) y carbónicos (24, 25).

En la Tabla 3 se detallan los géneros y especies de bacterias aisladas en este manantial.

Tabla 3. Géneros y especies de bacterias (nº y % de cepas).

Bacterias		Manantial (n= 42)	
<i>Phylum</i>	Géneros-Especies	nº	(%)
<i>Proteobacteria</i>	<i>Brevundimonas vesicularis</i>	1	2,4
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	3	7,1
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	5	12,0
<i>Actinobacteria</i>	<i>Brevibacterium linens</i>	1	2,4
	<i>Cellulomonas terrae</i>	3	7,1
	<i>Leifsonia aquatica</i>	4	9,5
	<i>Micrococcus luteus</i>	2	4,8
	<i>M. sedentarius</i>	1	2,4
	<i>M. varians</i>	2	4,8
	<i>Rhodococcus sp.</i>	6	14,3
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus cereus</i>	3	7,1
	<i>Staphylococcus cohnii</i>	1	2,4
	<i>S. epidermidis</i>	2	4,8
	<i>S. hominis</i>	3	7,1
	<i>S. sciuri</i>	3	7,1
	<i>S. xylosus</i>	1	2,4
	<i>Vagococcus fluvialis</i>	1	2,4

Varias cepas aisladas en estas aguas poseen pigmentos amarillos y naranjas lo que es frecuente en aguas minerales (16, 17), debido a que estos pigmentos protegen a las bacterias de las radiaciones evitando la muerte fotodinámica. Entre ellas, destacamos las especies: de bacilos Gram negativos *Stenotrophomonas maltophilia*, de bacilos Gram positivos *Cellulomonas terrea* y *Rhodococcus* y de cocos Gram positivos *Micrococcus luteus* (Figura 8).

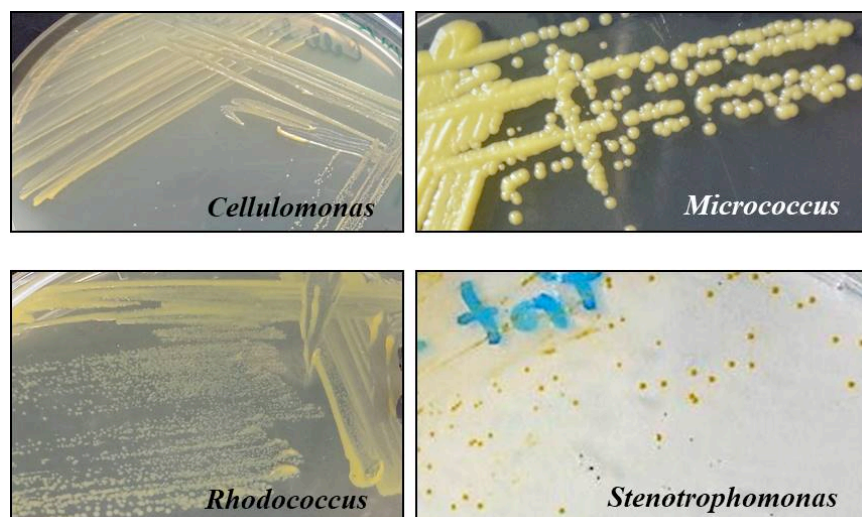


Figura 8. Bacterias pigmentadas.

3. CONCLUSIONES

En las muestras estudiadas no se han detectado indicadores de contaminación fecal ni microorganismos patógenos, por lo que cumplen con la normativa de aguas de consumo humano. La microbiota autóctona está constituida, principalmente, por bacterias oligotróficas, Gram positivas, lo que es habitual en los manantiales hipergeotermos. En el sondeo Sillero, utilizado en los tratamientos, predominan los cocos Gram positivos de la especie *Staphylococcus lugdunensis*. En el sondeo San Marcos hay más diversidad microbiana, siendo las principales especies *Bacillus licheniformis* y *Cupriavidus pauculus*. Se han detectado bacterias con actividad proteolítica, amilolítica nitrificante y amonificante que intervienen en los ciclos biogeoquímicos y contribuyen a la autodepuración de las aguas.

4. AGRADECIMIENTOS

Las autoras agradecen al propietario del Balneario, D. Jose María Morcillo, las facilidades dadas para la toma de muestras. Además, queremos agradecer a D.^a M.^a Elena Argüelles Rojo, técnico de laboratorio, su valiosa ayuda en la preparación del material de laboratorio y los medios de cultivo.

5. REFERENCIAS

1. Limón Montero A. Espejo cristalino de las aguas de España. Alcalá: Francisco García Fernández 1697: pp 115-118.
2. Gaceta de Madrid 16-04-1869, 106: 2.

3. Maraver F, Armijo F. Vademécum II de aguas mineromedicinales españolas. Madrid: Complutense 2010.
4. Mosso MA, de la Rosa MC, Vivar C, Arroyo G, Díaz F. Microbiología de las aguas mineromedicinales del manantial del Balneario de Lugo. In: Balneario de Lugo. Madrid: Real Academia Nacional de Farmacia 1994: 43-52.
5. Real Decreto 140/2003 de 7 de febrero sobre Criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano. BOE 45: 7228-7245.
6. Reasoner DJ, Geldreich E. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. Appl Environ Microbiol 1985; 49: 1-7.
7. Leclerc H, Moreau A. Microbiological safety of natural mineral water. FEMS Microbiol Rev 2002; 26: 207-222.
8. De la Rosa MC, Mosso MA, Prieto P, Ullán C. Microbiología del manantial mineromedicinal de Carratraca. An R Acad Nac Farm 1999; 65: 439-456.
9. De la Rosa MC, Pintado C, Rodríguez C, Mosso MA. Microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario de Alicún de las Torres. An R Acad Nac Farm 2009; 75: 763-780.
10. Mosso MA, de la Rosa MC. Microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario de Baños de la Concepción. An R Acad Nac Farm 2011; 77:57-73.
11. Orden de 8 de mayo de 1987. Métodos oficiales de análisis microbiológicos para la elaboración, circulación y comercio de aguas de bebida envasadas. BOE 114: 13964-13973.
12. Water quality. Detection and enumeration of *Legionella*. International Standard ISO 11731, 1998.
13. Mosso MA, Díaz F, de la Rosa MC. Microbiología de las aguas mineromedicinales de Archena. In: Estudios sobre el balneario de Archena. Madrid: Real Academia Nacional de Farmacia 1986: 23-32.
14. De la Rosa MC, Moro I. Estudio microbiológico de los manantiales de aguas mineromedicinales de Caldas de Bohí. An R Acad Nac Farm 1986; 52: 553-562.
15. De la Rosa MC, Díaz F, Mosso MA. Microbiología de las aguas mineromedicinales de Fuente Amarga. In: Estudios sobre el balneario de Fuente Amarga. Madrid: Real Academia Nacional de Farmacia 1985: 17-24.
16. Mosso MA, Sánchez MC, Rodríguez C, De la Rosa MC. Microbiología de los manantiales mineromedicinales del Balneario Cervantes. An R Acad Nac Farm 2006; 72: 285-304.

17. De la Rosa MC, Pintado C, Rodríguez C. Microbiología del agua mineromedicinal del Balneario de Villavieja. *An R Acad Nac Farm* 2016; 82:75-86.
18. Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DP. *Brock. Biología de los microorganismos*. Madrid: Pearson Educación 2009.
19. Stanier RY, Ingraham JL, Wheelis ML, Painter PR. *Microbiología*. Madrid: Ed. Reverté 1988; 46.
20. Atlas R, Bartha R. *Ecología microbiana y Microbiología ambiental*. 4ª ed. Madrid: Pearson Educación 2002: pp. 422-433.
21. De la Rosa MC, Mosso MA, Prieto MP. Microbiología del agua mineromedicinal del Balneario “El Paraíso” de Manzanera (Teruel). *An R Acad Nac Farm* 2001; 67: 173-183.
22. Mosso MA, de la Rosa MC, Vivar MC, Medina MR. Heterotrophic bacterial populations in the mineral Waters of thermal springs in Spain. *J Appl Bacteriol* 1994; 77: 370- 381.
23. Garrity G. *Bergey’s Manual of Sistematic Bacteriology*. 2nd ed. Vol.I. New York: Springer 2001.
24. Mosso MA, de la Rosa MC, Díaz F, Vivar C, Medina R. Microbiología del manantial de aguas mineromedicinales de Alange. In: *Estudios sobre el balneario de Alange*. Madrid: Real Academia Nacional de Farmacia 1990: 27-40.
25. Mosso MA, de la Rosa MC, Vivar C. Microbiología del manantial Hervideros del balneario de Cofrentes. *An R Acad Nac Farm* 1998; 64: 53-63.
26. Casanovas-Massana A, Blanch A. Diversity of the heterotrophic microbial population for distinguishing natural waters. *Int J of Food Microbiol* 2012; 153: 38-44.
27. Garrity G, Brenner D, Krieg N, Staley J. *Bergey’s Manual of Sistematic Bacteriology*. 2nd ed. Vol. II. The *Proteobacteria*. New York: Springer 2005.